

การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแอปเปิล

ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี

Genetic Relationship Assessment of Apples

Using HAT-RAPD Technique

นฤมล ธนานันต์* และ ขนิษฐา กิตติทรัพย์เจริญ

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ จังหวัดปทุมธานี

ธีระชัย ธนานันต์

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต

Narumol Thanananta* and Kanittha Kittisubjareng

Faculty of Science and Technology, Valaya Alongkorn Rajabhat University

under Royal Patronage, Pathum Thani Province

Theerachai Thanananta

Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University, Rangsit Centre

Received: December 25, 2023 ; Accepted: January 16, 2024

บทคัดย่อ

นำเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีมาประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแอปเปิล 14 ตัวอย่าง ที่จำหน่ายในประเทศไทย พบว่าไพรเมอร์แบบสุ่ม 31 จาก 72 ชนิด สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ จากนั้นจึงคัดเลือกไพรเมอร์แบบสุ่ม 20 ชนิด เพื่อสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ซึ่งได้ผลว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแอปเปิลทั้ง 14 ตัวอย่าง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และพบแถบดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะกับแอปเปิลแต่ละตัวอย่าง นอกจากนั้นงานวิจัยนี้ยังพบไพรเมอร์แบบสุ่ม 3 ชนิด ที่มีแนวโน้มจะใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับระบุตัวอย่างแอปเปิลได้ โดยแผนภูมิความสัมพันธ์ที่สร้างจากแถบดีเอ็นเอ ซึ่งให้ความหลากหลายสามารถแยกตัวอย่างแอปเปิลเป็น 3 กลุ่ม มีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกัน 0.57 ถึง 0.86

คำสำคัญ: แอปเปิล; ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม; แฮตอาร์เอพีดี

Abstract

High annealing temperature-random amplified polymorphic DNA (HAT-RAPD) technique was used to genetic relationship assessment of 14 apple samples that sold in Thailand. Thirty-one random

primers out of seventy-two were successful for DNA amplification. Then 20 random primers which gave clear amplified products were selected for DNA fingerprinting. The result showed significant differences among 14 samples and also showed some bands in each sample. Moreover, this research found 3 random primers which tended to be DNA markers for apple identification. A dendrogram constructed based on polymorphic bands showed genetic similarities among apples and separated to 3 clusters with similarity coefficients ranging from 0.57 to 0.86.

Keywords: apple; genetic relationship; high annealing temperature-random amplified polymorphic DNA (HAT-RAPD)

1. บทนำ

แอปเปิลเป็นไม้ผลเขตหนาว (temperate fruit) ที่นิยมบริโภคทั่วโลก โดยประเทศจีนเป็นผู้ส่งออกเป็นอันดับหนึ่ง รองลงมา คือ สหรัฐอเมริกา และโปแลนด์ ตามลำดับ แอปเปิลจัดอยู่ในสกุล *Malus* วงศ์ Rosaceae ส่วนใหญ่มีจีโนมเป็นดิพลอยด์ (diploid) มีจำนวนโครโมโซม $2n = 34$ แต่บางชนิดมีจีโนมเป็นทริพลอยด์ (triploid) เช่น *M. hupehensis* หรือ *M. coronaria* และบางชนิดมีจีโนมเป็นเตตราพลอยด์ (tetraploid) เช่น *M. sargentii* แอปเปิลมีมากมายหลากหลายพันธุ์เนื่องจากสามารถผสมข้ามพันธุ์ได้ง่าย (Korban, 1986) วัตถุประสงค์ในการผสมพันธุ์ คือ ต้องการให้มีความต้านทานศัตรูพืช รวมทั้งให้ผลที่มีลักษณะสวยงามและรสชาติหวานกรอบ (Korban & Chen, 1992; Robin *et al.*, 2001) ทั้งนี้เพื่อเพิ่มศักยภาพในการแข่งขันทางการตลาด เน้นรูปร่าง ลักษณะ ขนาด สี และรสชาติตามความต้องการของผู้บริโภค โดยแอปเปิลเป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระ (Davey & Keulemans, 2004; Thielen *et al.*, 2004; Lichtenhaler & Marx, 2005) ซึ่งอาจช่วยป้องกันโรคและชะลอความชรา (Raskin & Ripoll, 2004) อย่างไรก็ตาม แอปเปิลก็มีสารก่อให้เกิดภูมิแพ้ด้วย (Gao *et al.*, 2005)

แอปเปิลลูกผสมที่ได้จากการผสมข้ามพันธุ์นั้น บางครั้งมีลักษณะสัณฐานที่คล้ายคลึงกันและแยกกันได้ยาก จึงมีการนำเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) มาช่วยในโปรแกรมการปรับปรุงพันธุ์ โดยมีการสร้างแผนที่จีโนมของแอปเปิลด้วยอาร์เอพีดี (RAPD, random amplified polymorphic DNA) (Hemal *et al.*, 1994) วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแอปเปิลด้วยอาร์เอพีดี (FORT *et al.*, 2002) ค้นหายีนในแอปเปิลด้วยไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellite) และเอเอฟแอลพี (AFLP, amplified fragment length polymorphism) (Sun *et al.*, 2012)

ประเทศไทยนำเข้าผลแอปเปิลสดจากหลายทวีป ได้แก่ เอเชีย ยุโรป อเมริกาเหนือ และออสเตรเลีย และในตลาดก็มีผลแอปเปิลสดจำหน่ายหลากหลายพันธุ์ ดังนั้นจึงมีแนวคิดที่จะประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแอปเปิลด้วยแฮตอาร์เอพีดี (HAT-RAPD, high annealing temperature-random amplified polymorphic DNA) ซึ่งเป็นการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) ด้วยไพรเมอร์แบบสุ่ม (random primer) ขนาด 8-12 นิวคลีโอไทด์ โดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน (polymerase chain reaction, PCR) ซึ่ง

สะดวก รวดเร็ว ใช้ดีเอ็นเอปริมาณน้อย ไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลลำดับดีเอ็นเอ และประหยัดค่าใช้จ่ายกว่าเทคนิคเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดอื่น (Thanananta *et al.*, 2012)

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแอปเปิลที่จำหน่ายในประเทศไทยและตรวจหาเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดี (HAT-RAPD marker) ที่ใช้ระบุตัวอย่างแอปเปิลได้ ซึ่งจะได้ข้อมูลพื้นฐานที่สามารถประยุกต์ใช้ในการคุ้มครองผู้บริโภคและงานนิติวิทยาศาสตร์

2. วิธีการ

2.1 ตัวอย่างแอปเปิล

ผลแอปเปิลสดที่ใช้ในงานวิจัยนี้มี 14 ตัวอย่าง ได้แก่ 1-มิสซูโกะฮันนี่คอร์ 2-ฟูจิพรีเมียม (จีน) 3-ฟูจิพรีเมียม (USA) 4-แดงพรีเมียม 5-เขียวพรีเมียม 6-กาล่าพรีเมียม 7-แอมโบรเซีย 8-แปซิฟิกโรส 9-ฟังก์เลตต์ 10-ฟูจิจิน 11-ญี่ปุ่นเซไกอิชิ 12-ญี่ปุ่นมุสึ 13-ญี่ปุ่นคินเซย และ 14-โอรีนญี่ปุ่น ซึ่งซื้อจากซูเปอร์มาร์เก็ตชั้นนำในจังหวัดปทุมธานี

2.2 การสกัดดีเอ็นเอ

นำเปลือกผลแอปเปิลสด ทั้ง 14 ตัวอย่าง มาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีประยุกต์จาก Doyle และ Doyle (1987) ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอที่ได้ด้วยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (nm) และตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) ในเจลอะกาโรส (agarose gel) 0.8 เปอร์เซ็นต์ (Sambrook *et al.*, 1989)

2.3 การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี

ตรวจหาไพรมอร์แบบสุ่มที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยรวมดีเอ็นเอของแอปเปิลทั้ง 14 ตัวอย่าง เข้าด้วยกัน แล้วนำไปทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยไพรมอร์แบบสุ่ม ขนาด 12 นิวคลีโอไทด์ จาก Wako Company (Japan) ทั้งหมด 6 ชุด คือ A2, B2, C2, D2, E2 และ F2 ซึ่งแต่ละชุดมีไพรมอร์ 12 ชนิด รวมทั้งสิ้น 72 ชนิด

2.4 การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแอปเปิล

คัดเลือกไพรมอร์ที่ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเออย่างชัดเจนมาตรวจสอบกับดีเอ็นเอของแอปเปิลแต่ละตัวอย่าง โดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสซ้ำ 3 ครั้ง ทั้งนี้เพื่อยืนยันผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (Thanananta *et al.*, 2012)

2.5 การวิเคราะห์ผล

เปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแอปเปิลที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี โดยเปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่ได้ทั้งหมด แล้ววิเคราะห์ค่าดัชนีความเหมือน (similarity index) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป NTSYS-pc รุ่น 2.0 และสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ (dendrogram) ด้วยวิธีการจัดกลุ่มแบบ UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) (Rohlf, 2002)

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

การใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม 72 ชนิด เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอรวมของแอปเปิลด้วยเทคนิคแอสตาร์เอพีดี พบไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ 31 ชนิด (43.05 %) เมื่อคัดเลือกไพรเมอร์ 20 ชนิด ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้อย่างชัดเจนมาสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแอปเปิลแต่ละตัวอย่าง จำนวน 14 ตัวอย่าง ปรากฏว่าพบแถบดีเอ็นเอรวมทั้งสิ้น 155 แถบ ขนาดประมาณ 200-3,000 คู่เบส ซึ่งเป็นแถบดีเอ็นเอที่ไม่มีความหลากหลาย (monomorphic band) 11 แถบ (7.10 %) และเป็นแถบดีเอ็นเอที่มีความหลากหลาย (polymorphic band) 144 แถบ (91.71 %) โดยลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคแอสตาร์เอพีดีมีรูปแบบจำเพาะต่อแอปเปิลแต่ละตัวอย่าง (Fig. 1) และพบแถบดีเอ็นเอบางแถบที่สามารถใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับจัดจำแนกตัวอย่างของแอปเปิล นอกจากนี้ยังพบไพรเมอร์ที่ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอซึ่งแยกความแตกต่างของแอปเปิลแต่ละตัวอย่างออกจากกันได้ด้วยไพรเมอร์เพียงชนิดเดียว จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ C29 (GTCGCCTTACCA), F22 (AAGAGGGTTGAC) และ F31 (ATCGTGACGCCG)

เมื่อวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคแอสตาร์เอพีดีด้วยโปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.0 และเลือกวิธีจัดกลุ่มแบบ UPGMA โดยคำนวณค่าดัชนีความเหมือนและสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ พบว่าแอปเปิลทั้ง 14 ตัวอย่าง ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน 0.57 ถึง 0.86 (Fig. 2) เมื่อพิจารณาที่ค่าดัชนีความเหมือน 0.65 พบว่าแบ่งแอปเปิลทั้ง 14 ตัวอย่าง เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่ม 1 ได้แก่ มิสซูโกะฮันนี่คอร์ กลุ่ม 2 ได้แก่ ฟุจิพรีเมียม (จีน) ฟุจิพรีเมียม (USA) เขียวพรีเมียม กาล่าพรีเมียม แอมโบรเซีย ฟุจิจิน ฟิงค์เลดี้ แปซิฟิกโรส ญี่ปุ่นมุทลี ญี่ปุ่นเซโกอิชิ โอรีนญี่ปุ่น และญี่ปุ่นคินเซย และกลุ่ม 3 ได้แก่ แดงพรีเมียม (Fig. 3) ผลการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าแอปเปิลมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง โดยแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างตัวอย่างสามารถใช้เป็นเครื่องหมายแอสตาร์เอพีดีสำหรับการระบุตัวอย่างแอปเปิล และแถบดีเอ็นเอบางแถบที่จำเพาะต่อตัวอย่างสามารถพัฒนาเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อตัวอย่างแอปเปิล ผลงานวิจัยนี้ยังสนับสนุนศักยภาพของเทคนิคแอสตาร์เอพีดีในการระบุพันธุ์พืชต่าง ๆ และสนับสนุน Forte และคณะ (2002) ที่ใช้เทคนิคอาร์เอพีดีจำแนกชนิดของแอปเปิลและศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ซึ่งแบ่งแอปเปิลเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 คือ แอปเปิลของทวีปยุโรปและอเมริกาเหนือ และกลุ่มที่ 2 คือ แอปเปิลที่มีต้นกำเนิดจากทางตะวันออกของทวีปเอเชีย นอกจากนี้ผลการวิจัยยังเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญสำหรับใช้ประโยชน์ด้านการศึกษาวิจัย การคุ้มครองผู้บริโภค และงานนิติวิทยาศาสตร์

เทคนิคแอสตาร์เอพีดีสามารถประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแอปเปิลเช่นเดียวกับพืชชนิดอื่น ได้แก่ กล้วยไม้สกุลหวาย (Phanroophthaw *et al.*, 2016; Maneenet *et al.*, 2017) กล้วยไม้สกุลเอื้องเทียน (Thanananta, *et al.*, 2016) กล้วยไม้รองเท้านารี (Meesangiem, *et al.*, 2018) ทูเรียน (Singhsilarak, *et al.*, 2018) บัวสาย (Suksakul, *et al.*, 2018) พืชครามสกุล *Indigofera* (Buaban, *et al.*, 2020) เป็นต้น

4. สรุป

การตรวจสอบแอปเปิลทั้ง 14 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิคแอสตาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม 20 ชนิด พบว่าสามารถแยกความแตกต่างระหว่างตัวอย่างด้วยแถบดีเอ็นเอจำเพาะกับตัวอย่างแอปเปิล และตรวจพบไพรเมอร์แบบสุ่ม 3 ชนิด ที่สามารถระบุตัวอย่างแอปเปิลด้วยการใช้ไพรเมอร์เพียงชนิดเดียว เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทาง

พันธุกรรมพบว่ามีความสัมพันธ์ความเหมือน 0.57 ถึง 0.86 และแผนภูมิความสัมพันธ์ของแอปเปิ้ลที่ได้จากเทคนิค แสตอาร์เอพีดีที่ค่าดัชนีความเหมือน 0.65 สามารถแยกแอปเปิ้ลเป็น 3 กลุ่ม

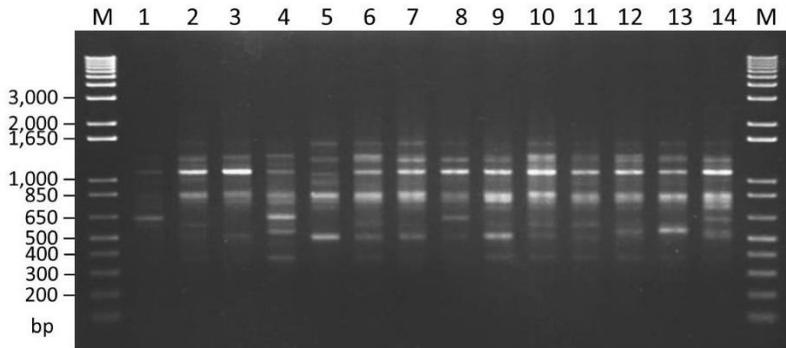


Figure 1 DNA fingerprinting of 14 apple samples using HAT-RAPD by F31 primer (ATCGTGACGCCG) [Lane M: DNA marker 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen™ Life Technology, USA), Lane 1-14: 14 samples of apple that sold in Thailand]

Miss Zuko Honey Core	1.00																
Fuji Premium (China)	0.69	1.00															
Fuji Premium (USA)	0.67	0.84	1.00														
Red Premium	0.57	0.59	0.57	1.00													
Green Premium	0.57	0.68	0.72	0.51	1.00												
Gala Premium	0.60	0.67	0.67	0.58	0.74	1.00											
Ambrosia	0.60	0.69	0.68	0.57	0.68	0.86	1.00										
Pacific Rose	0.59	0.64	0.64	0.53	0.71	0.74	0.74	1.00									
Pink Lady	0.57	0.68	0.68	0.58	0.74	0.80	0.77	0.73	1.00								
China Fuji	0.57	0.70	0.68	0.62	0.70	0.79	0.83	0.70	0.78	1.00							
Japanese Sekaiichi	0.58	0.68	0.59	0.61	0.58	0.67	0.68	0.62	0.71	0.73	1.00						
Japanese Mutsu	0.61	0.72	0.66	0.55	0.66	0.68	0.72	0.65	0.75	0.76	0.68	1.00					
Japanese Kinchey	0.55	0.67	0.59	0.54	0.59	0.71	0.69	0.61	0.67	0.67	0.65	0.71	1.00				
Japanese Orin	0.64	0.70	0.64	0.59	0.68	0.67	0.68	0.65	0.69	0.69	0.63	0.72	0.65	1.00			

Figure 2 Genetic similarity coefficient matrix for 14 individuals of apple by HAT-RAPD

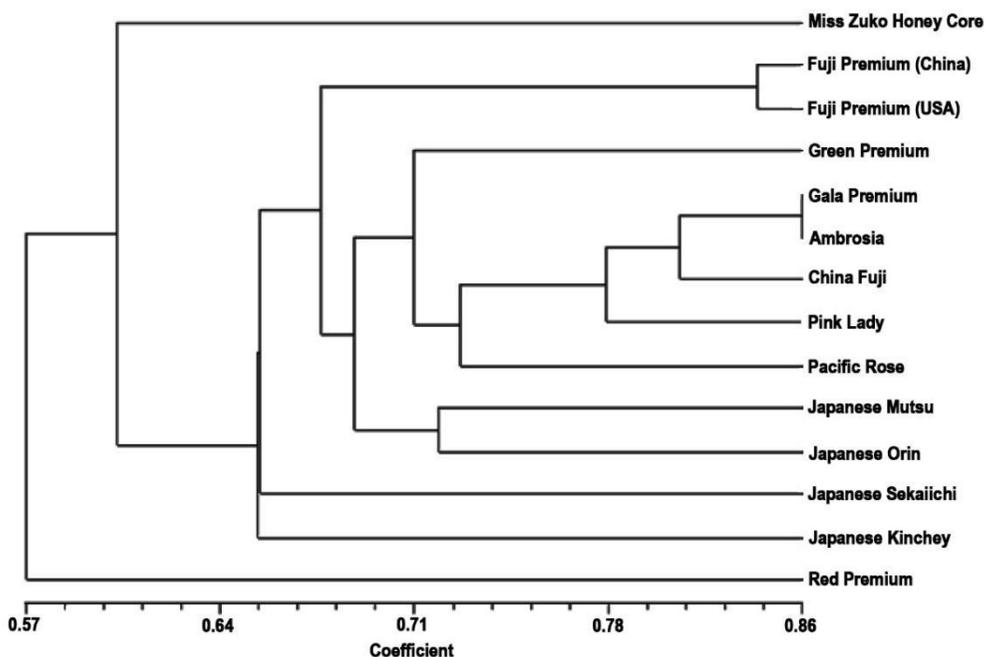


Figure 3 A dendrogram for 14 individuals of apple by UPGMA cluster analysis of the genetic similarity values by HAT-RAPD

5. References

Buaban, S., Thanananta, T., & Thanananta, N. (2020). Genetic relationship assessment of *Indigofera* using HAT-RAPD technique. *Thai Journal of Science Technology*, 9(3), 378-387.

Davey, M.W., & Keulemans, J. (2004). Determining the potential to breed for enhanced antioxidants tatus in *Malus*: Mean inter and intra varietal fruit vitamin C and glutathione contents at harvest and their evolution during storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), 8031-8038.

Doyle, J.J., & Doyle, J.L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical bulletin*, 19(1), 11-15.

Forte, A.V., Ignatov, A.N., Ponomarenko, V.V., Dorokhov D.B., & Savelyev, N.I. (2002). Phylogeny of the *Malus* (apple tree) species, inferred from the morphological traits and molecular DNA analysis. *Russian Journal of Genetics*, 38(10), 1150-1160.

Gao, Z.S., van de Weg, W.E., Schaart, J.G., Schouten, H.J., Tran, D.H., Kodde, L.P., van der Meer, I.M., van der Geest, A. H. M. , Kodde, J., Breiteneder, H., Hoffmann-Sommergruber, K., Bosch, D., &

- Gilissen, L.J.W.J. (2005). Genomic cloning and linkage mapping of the *Mal d 1 (PR-10)* gene family in apple (*Malus domestica*). *Theoretical and Applied Genetics*, 111(1), 171-183.
- Hemmat, M., Weeden, N.F., Manganaris, A.G., & Lawson, D.M. (1994). Molecular marker linkage map for apple. *Journal of Heredity*, 85(1), 4-11.
- Korban, S.S., & Chen, H. (1992). Apple. Location: Hammerschlag, F.A., & Litz, R.E. (Eds.). *Biotechnology of Perennial Fruit Crops*. Location: CAB International, Wallingford, pp 203-227.
- Korban, S.S. (1986). Interspecific hybridization in *Malus*. *HortScience*, 21(1), 41-48.
- Lichtenthaler, R., & Marx, F. (2005). Total oxidant scavenging capacities of common European fruit and vegetable juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(1), 103-110.
- Maneenet, T., Thanananta, T., & Thanananta, N. (2017). Analysis of genetic relationship and identification of *Dendrobium* Section Callista using HAT-RAPD markers. *Thai Journal of Science Technology*, 6(4), 316-323.
- Meesangiem, T., Damrianant, S., Thanananta, T., & Thanananta, N. (2018). Genetic relationship among *Paphiopedilum* subgenus *Brachypetalum* section *Brachypetalum* using HAT-RAPD markers. *Thai Journal of Science Technology*, 7(1), 99-105.
- Phanroopthaw, J., Thanananta, T., & Thanananta, N. (2016). Genetic relationships between *Dendrobium* section *Nigrohirsuta* and their hybrids base on HAT-RAPD. *Thai Journal of Science Technology*, 5(1), 77-87.
- Raskin, I., & Ripoll, C. (2004). Can an apple a day keep the doctor away ? . *Current Pharmaceutical Design*, 10(27), 3419-3429.
- Robinson, J.P., Harris, S.A., & Juniper, B.E. (2001). Taxonomy of the genus *Malus* Mill. (Rosaceae) with emphasis on the cultivated apple, *Malus domestica* Borkh. *Plant Systematics and Evolution*, 226(1), 35-58.
- Rohlf, F.J. (2002). *NTSYSpc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*. Location: Applied Biostatistics, Inc., New York.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed.* Location: Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Singhsilarak, T., Thanananta, T., & Thanananta, N. (2018). Genetic relationship assessment and identification of durian using HAT-RAPD markers. *Thai Journal of Science Technology*, 7(1), 89-98.
- Suksakul, S., Thanananta, T., & Thanananta, N. (2018). Genetic relationship assessment and identification of *Nymphaea* sp. and their hybrids using HAT-RAPD. *Thai Journal of Science Technology*, 7(4), 418-426.

- Sun, H.H., Zhao, Y.O., & Li, C.M. (2012). Identification of markers linked to major gene loci involved in determination of fruit shape index of apples (*Malus domestica*). *Euphytica*, 185(2), 158-193.
- Thanananta, N., Hongtongdee, P., & Thanananta, T. (2016). Identification and assessment of genetic relationship among *Coelogyne* (Orchidaceae) using HAT-RAPD. *Thai Journal of Science Technology*, 5(1), 88-97.
- Thanananta, N., Prasit, V., & Thannananta, T. (2012). Identification of rice cultivars KDML105 and its improved cultivars by using HAT-RAPD technique. *Thai Journal of Science and Technology*, 1(3), 169-179.
- Thielen, C., Will, F., Zacharias, J., Dietrich, H., & Jacob, H. (2004). Polyphenols in apples: Distribution of polyphenols in apple tissue and comparison of fruit and juice. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 100(10), 389-398.
- Williams, J. G. , Kubelik, A. R. , Livak, K. J. , Rafalski, J. A. , & Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18(22), 6531-5 doi: 10.1093/nar/18.22.6531. PMID: 1979162; PMCID: PMC332606.